

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan di kelompokkan menjadi 4 kelompok dengan ulangan masing-masing 5 kali ulangan yang terdiri dari:

1. Kelompok P1 : Kelompok kontrol yang diberi aquades sebanyak 1 ml sebanyak 5 ekor mencit serta makan dan minum secara ad libitum.
2. Kelompok P2 : Kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi larutan ekstrak buah pare dengan dosis 0,02 gram/kg/bb, makan dan minum secara ad libitum.
3. Kelompok P3 : kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi larutan ekstrak buah pare dengan dosis 0,03 gram/kg/bb gram, makan dan minum secara ad libitum.
4. Kelompok P4 : kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak buah pare dengan dosis 0,04 gram/kg/bb makan dan minum secara ad libitum.
5. Kelompok P5 : kelompok perlakuan sebanyak 5 ekor mencit yang diberi ekstrak buah pare dengan dosis 0,05 gram/kg/bb makan dan minum secara ad libitum

3.2 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Riset Biokimia Universitas Islam Negeri (UIN) Malang pada bulan Januari-Februari 2009.

3.3 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Ekstrak buah pare dengan dosis 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 gram/kg/bb mencit.
2. Variabel tergantung : jumlah sel-sel spermatogenik yaitu sel spermatogonia, spermatosit dan spermatid.
3. Variabel kendali : Jenis hewan uji coba yaitu mencit galur balb/c jenis kelamin jantan, fertil, kandang atau bak plastik dengan alas sekam, pakan mencit dan air minum.

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang dipakai adalah mencit (*Mus musculus*) galur balb/c jenis kelamin jantan, fertil, umur 2-3 bulan dengan berat badan rata-rata 20-30 gram sebanyak 25 ekor.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

1. Kandang hewan coba (bak plastik)
2. Tempat makan dan minum mencit
3. Alat pencekok oral (gavage)

4. Timbangan analitik
5. Beaker glass
6. Kaca glass
7. Obyek glass
8. Kaos tangan
9. Blender
10. Ayakan tepung/ kertas saring
11. Mikroskop
12. Hand counter

3.5.2 Bahan

1. Serbuk buah pare
2. Aquades steril
3. Pakan mencit berupa pellet dengan kandungan protein 10%, lemak 3 % serat 8% dan kadar air 12%
4. Formalin 10%
5. Alkohol 70%
6. Metanol

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Persiapan Hewan Coba

Sebelum penelitian dimulai dipersiapkan tempat pemeliharaan hewan coba yaitu: kandang (bak plastik) berbentuk segi empat, sekam, tempat makan dan minum mencit. Uji fertilitas mencit jantan dapat dilakukan dengan cara mengawinkan seluruh mencit yang akan digunakan dalam penelitian ini secara

alami dengan mencit betina. Hanya mencit yang terbukti fertil, yaitu yang dapat menyebabkan kebuntingan pada mencit betina, yang dapat digunakan sebagai sampel penelitian. Mencit jantan yang fertil ditempatkan terpisah dan diaklimatisasi di laboratorium selama 1 minggu

3.6.2 Persiapan Perlakuan

Bahan tanaman yang gunakan dalam penelitian ini adalah daging buah pare yang diperoleh dari pasar Dinoyo Malang pada bulan Januari 2009. Selanjutnya sebanyak 2 kg buah pare dicuci, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diletakkan ditempat yang terbuka dengan aliran udara yang baik dan tidak terkena sinar matahari langsung. Buah pare yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan blender sehingga menjadi serbuk. Serbuk buah pare ditimbang sebanyak 1000 gram dan diekstraksi secara maserasi dengan menggunakan pelarut metanol selama 24 jam kemudian disaring. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat berwarna coklat tua.

3.6.3 Kegiatan Penelitian

Pemberian ekstrak buah pare dilarutkan dengan aquades pada suhu 80⁰C dan di diamkan selama 24 jam. Ekstrak buah pare diberikan secara oral menggunakan gavage dengan volume tidak melebihi volume intragestik (1 ml) mencit. Ekstrak buah pare diberikan pada mencit sekali setiap hari yaitu pada pagi

hari jam 08.00-10.30 WIB selama 36 hari dengan dosis 0,02-0,05 kg/bb mencit. Pada hari ke-37 seluruh mencit dibius dengan eter atau kloroform, dibedah dan diambil kedua testisnya untuk dibuat preparat mikroanatomi. Sediaan mikroanatomi testis mencit diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali (10 X 40) dan difoto. Pengamatan dilakukan pada tubulus seminiferi yang terpotong bundar dan diambil secara random. Perhitungan dilakukan pada 3 tubuli dan untuk setiap tubulus diambil 4 data yang diperoleh dari bagian atas kanan, atas kiri, bawah kanan dan bawah kiri. Parameter yang diamati meliputi jumlah sel-sel spermatogenik yaitu sel spermatogonia, spermatosit dan spermatid.

Tabel 3.1 Kegiatan Pengamatan

Perlakuan	Ulangan					Jumlah	Rata-rata
	1	2	3	4	5		
P1							
P2							
P3							
P4							
P5							

3.6.4 Pembuatan Preparat Histologi Testis Mencit

1. Tahap pertama *coating*, dimulai dengan menandai obyek glass yang akan digunakan dengan kikir kaca pada area tepi lalu direndam dalam alkohol 70 % minimal semalam, kemudian obyek glass dikeringkan dengan tissue dan dilakukan perendaman dalam larutan gelatin 0,5 % selama 30-40 detik per slide lalu dikeringkan dengan posisi disandarkan sehingga gelatin yang melapisi kaca dapat merata.
2. Tahap kedua, organ testis yang telah disimpan dalam larutan formalin 10 % dicuci dengan alkohol selama 2 jam dilanjutkan dengan pencucian secara

bertingkat dengan alkohol yaitu alkohol 90 %, 95 %, etanol absolut (3 kali) xylol (3 kali) masing-masing selama 20 menit.

3. Tahap ketiga adalah proses *infiltrasi* yaitu dengan menambahkan parafin 3 kali dalam 30 menit
4. Tahap keempat adalah *embedding* bahan beserta parafin dituangkan dalam kotak karton atau wadah yang sudah disiapkan dan diatur sehingga tidak ada udara yang terperangkap disekat bahan. Blok parafin disimpan selama semalam dalam suhu ruang kemudian diinkubasi dalam *freezer* sehingga benar-benar keras.
5. Tahap pemotongan dengan mikrotom. Cutter dipanaskan dan ditempelkan pada dasar balok sehingga parafin sedikit meleleh. *Holder* dijepitkan pada mikrotom putar dan ditata sejajar dengan pisau mikrotom. Pngirisan atau penyatan dimulai dengan mengatur ketebalan, untuk testis dipotong dengan ukuran 5 μ m kemudian pita hasil irisan diambil dengan menggunakan kuas dimasukkan ke dalam air dingin untuk membuka lipatan kemudian masukkan dalam air hangat dan dilakukan pemilihan irisan yang terbaik. Irisan yang terpilih diambil dengan *obyek glass* yang sudah dicoating lalu dikeringkan diatas *hot plate*.
6. Tahap deparafisasi yakni preparat dimasukkan dalam xylol sebanyak 2 X 5 menit
7. Tahap rehidrasi, preparat dimasukkan dalam larutan etanol bertingkat mulai dari etanol absolut (2 kali) etanol 95%, 90%, 80% dan 70% masing-

masing selama 5 menit. Kemudian preparat direndam dalam aquades selama 10 menit.

8. tahap pewarnaan preparat ditetesi dengan *hematoxylen* selama 3 menit atau sampai didapatkan hasil warna yang terbaik. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit. Setelah itu preparat dimasukkan dalam pewarna eosin alkohol selama 30 menit dan dibilas dengan aquades selama 5 menit.
9. Tahap dehidrasi, preparat direndam dalam etanol 80%, 90%, 95% dan etanol absolut (2 kali) masing-masing selama 5 menit.
10. Tahap *clearing* dalam larutan xylol 2 kali selama 5 menit dikeringanginkan.
11. *Mounting* dengan entellan hasil akhir diamati dengan mikrosko dan dipotret kemudian data dicatat.

3.7 Analisis Data

Jumlah sel-sel spermatogenik yaitu sel spermatogonia, spermatosit dan spermatid dianalisis dengan menggunakan analisis ANOVA satu arah. ANOVA digunakan untuk mengetahui tingkat perbedaan antara keempat perlakuan tersebut. Apabila hasil analisis didapatkan nilai $F_{hitung} > F_{tabel}$ hal ini menunjukkan adanya perbedaan antara keempat perlakuan ekstrak buah pare tersebut. Untuk mengetahui tingkat perbedaan nyata maka perlu dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf signifikansi 1%.